

# LACTATE DEHYDROGENASE GENE AND LACTATE DEHYDROGENASE GENE DISTRUPTION STRAIN

[71] Applicant: MITSUBISHI CHEM CORP

[72] Inventors: HATAKEYAMA KAZUHISA; KADOIDE YUKIE; KOBAYASHI MIKI; TERASAWA ...

[21] Application No.: JP199830594A

[22] Filed: 19980128

[43] Published: 19990803

[30] Priority: JP JP199830594A 19980128

```

Met Lys Glu Thr Val Gly Asn Lys Ile Val Leu Ile Gly Ala Gly Asp
      5              10              15
Val Gly Val Ala Tyr Ala Tyr Ala Leu Ile Asn Glu Gly Met Ala Asp
      20              25              30
His Leu Ala Ile Ile Asp Ile Asp Glu Lys Lys Leu Gly Gly Asn Val
      35              40              45
      :
      :
      :
Gly Thr Pro Ala Val Val Asn Arg Arg Gly Ile Arg Arg Val Val Glu
      275              280              285
Leu Gly Ile Thr Asp His Glu Met Glu Arg Phe Lys His Ser Ala Asn
      290              295              300
Thr Leu Arg Glu Ile Glu Lys Glu Phe Phe
      305              310              314

```

[Go to Fulltext](#)

## [57] Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject new gene consisting of a DNA encoding a protein with a specific amino acid sequence, capable of giving a lactate dehydrogenase gene disruption strain of microorganisms, and enabling byproduct lactic acid to be reduced in the production of fine chemicals.

**SOLUTION:** This gene is a new lactate dehydrogenase gene encoding a protein with an amino acid sequence of the formula, or a protein with an amino acid sequence wherein one or several amino acids are deleted, substituted or added in the amino acid sequence of the above formula, also having lactate dehydrogenase activity, is useful for e.g. the production of a lactate dehydrogenase gene-destructive strain of microorganisms under the principle of homologous recombination with a chromosome DNA, and is capable of reducing byproduct lactic acid in the production of various fine chemicals such as amino acid and other organic acids by the use of the above disruption strain. This gene is obtained by screening a chromosome DNA library of corynebacterium such as Brevibacterium flavum by the use of its partial fragment.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO&Japio

[52] US Class:

[51] Int'l Class: C12N001509 C12P000744 C12N000121 C12P001304

[52] ECLA:

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-206385

(43) 公開日 平成11年(1999) 8月3日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00
1/21		1/21
C 1 2 P 7/44		C 1 2 P 7/44
13/04		13/04
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-30594

(22) 出願日 平成10年(1998) 1月28日

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 畠山 和久

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 角出 幸恵

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(74) 代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子及び該遺伝子破壊株

(57) 【要約】

【課題】 微生物のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株を提供する。

【解決手段】 配列番号1に示す塩基配列を有するDNA断片もしくはその一部、又はこのDNAと生理的条件下でハイブリダイズし得るDNA断片もしくはその一部がベクターに連結されてなる組換えベクターDNAを、微生物細胞に導入し、この微生物細胞の染色体DNA上のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子と前記DNA断片との相同組換えによりラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項1記載のDNA。

(a) 配列番号1に示す塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に示す塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項3】 請求項1記載のDNAがベクターに連結されてなる組換えベクターDNA。

【請求項4】 配列番号1記載のDNAもしくはこのDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA、又はその一部がベクターに連結されてなる組換えベクターDNA。

【請求項5】 請求項1若しくは請求項2記載のDNA、又は請求項3若しくは請求項4記載の組換えベクターDNAと、微生物細胞の染色体DNA上のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子との相同組換えによりラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊された、微生物のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株。

【請求項6】 ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の親株が、コリネ型細菌であることを特徴とする請求項5記載のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株。

【請求項7】 コリネ型細菌が、プレバクテリウム・フラバム MJ-233株であることを特徴とする請求項5記載のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株。

【請求項8】 請求項5～7のいずれか一項に記載のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株を培地で培養し、その培養物からアミノ酸または有機酸(乳酸を除く)を採取することを特徴とする、アミノ酸または有機酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ラクテートデヒドロゲナーゼをコードするDNA断片及びそれを用いたラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の作成方法に関する。更に詳しくは、プレバクテリウム・フラバム等のコリネ型細菌由来のラクテートデヒドロゲナーゼをコードするDNA断片及びそれを用いた染色体DNAとの相同性組換えの原理による、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の作成方法に関する。

【0002】 乳酸は、アミノ酸、有機酸等の各種ファ

インケミカルズを製造する場合の副生物である。

【0003】

【従来の技術】 ラクテートデヒドロゲナーゼは、ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド(NADH)を補酵素として、ピルビン酸を還元して乳酸を生成する酵素であるが、大腸菌あるいはコリネ型細菌等の微生物を用いて、リジン、トレオニン、イソロイシン、グルタミン酸等のアミノ酸、および、コハク酸、フマル酸、クエン酸等の有機酸等の各種ファインケミカルズを製造しようという場合は、副生物として乳酸等を生成する原因となる。そこで、従来は、例えばリジン製造において副生物の乳酸生成を抑える方法として、培養中の酸素供給濃度を十分に保つことにより乳酸の生成を抑える方法などが知られていた(K.Akashi et al., Agric.Biol. Chem., 43, 2087, 1979)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上記方法は、ファインケミカルズの製造に用いる微生物の培養中の、酸素濃度をコントロールするという煩雑な操作等が必要となり、ファインケミカルズを製造しようとする場合において作業効率が低減する結果となる。そこで、このように乳酸生成を抑えるために酸素濃度をコントロールする必要のない、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性の低減あるいは欠如した菌株を取得することが望まれていた。

【0005】 ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊された微生物菌株としては、大腸菌(*Escherichia coli*) (J.Bacteriol., Vol. 153, p. 588-596)等で知られているが、これらの菌株を得る方法は、ランダム変異導入法により変異導入した菌株の中からスクリーニングするという煩雑な実験操作を要する方法であり、これまでに、アミノ酸、あるいは、有機酸等のファインケミカルズ製造において産業上重要なコリネ型細菌において取得された例はなく、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊されたコリネ型細菌の簡便な取得方法が望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、遺伝子組換えの手法を駆使することにより、コリネ型細菌からラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子DNAを単離することに成功し、該DNA断片を用いることにより効率的にラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株を作製することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】 すなわち、本発明の要旨は、下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNAにある。

(A) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ラクテートデヒドロゲナー

ぜ活性を有するタンパク質。

【0008】上記DNAとして具体的には、下記(a)又は(b)に示すDNAが挙げられる。

(a) 配列番号1に示す塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に示す塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0009】また本発明は、前記DNAがベクターに連結されてなる組換えベクターDNA、及び、配列番号1記載のDNAもしくはこのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、又はその一部がベクターに連結されてなる組換えベクターDNAを提供する。

【0010】本発明はさらに、前記DNA又は組換えベクターDNAと、微生物細胞の染色体DNA上のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子との相同組換えによりラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊された、微生物のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株を提供する。

【0011】本発明はまた、前記ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株を培地で培養し、その培養物からアミノ酸または有機酸(有機酸を除く)を採取することを特徴とする、アミノ酸または有機酸の製造方法を提供する。

【0012】上記ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の親株としては、コリネ型細菌、より具体的には、プレバクテリウム・フラバム MJ-233株が挙げられる。本発明の「ラクテートデヒドロゲナーゼ(L-lactate dehydrogenase: EC 1.1.1.27)」とは、ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド(NADH)を補酵素として、ピルビン酸を還元して乳酸を生成する酵素を意味する。また、本明細書では、ラクテートデヒドロゲナーゼをコードするDNAを、便宜上「ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子」ということがある。以下、本発明について詳細に説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明のDNAは、ラクテートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子であり、前記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNAである。

【0014】本発明のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子は、本発明によりその塩基配列が決定されたので、この配列に基づいて合成することも可能であるが、本発明においてはコリネ型細菌からクローニングすることにより、初めて得られたものである。ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の供給源としては、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性を有するコリネ型細菌であれば特に制限はない。

【0015】上記のようなコリネ型細菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、プレバクテリウム・

ラクトファーメンタム、プレバクテリウム・アンモニアゲネス、プレバクテリウム・フラバム等が挙げられる。さらに具体的には、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233株が挙げられる。本菌株は、昭和50年4月28日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(現生命工学工業技術研究所)に微工研菌寄第3068号として寄託され、昭和56年5月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、微工研条寄第1497号(FERM BP-1497)の受託番号で寄託されている。

【0016】以下に、上記微生物からラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子DNA断片を取得する方法、該遺伝子DNA断片を用いたラクテートデヒドロゲナーゼ破壊株の作製方法の一例を説明する。

【0017】本発明のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子DNA断片は、コリネ型細菌の染色体DNA、具体的には、プレバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*) MJ-233(FERM BP-1497)株等の染色体DNAから以下に述べる方法で単離、塩基配列決定することができる。

【0018】まず、上記コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233を常法[例えば、特開昭51-130592参照]に従い培養し、培養物から菌体を集め、該菌体から染色体DNAを抽出する。染色体DNAは、例えば、特開平5-15378の実施例1(A)に記載の方法等により菌体から容易に抽出することができる。

【0019】上記菌株より染色体DNAを抽出する際には、適当な培地で培養した該菌株の菌体を使用することができるが、培養した菌体を集菌後に凍結保存した保存試料を使用することも可能である。

【0020】枯草菌(バチルス・サチリス)等のラクテートデヒドロゲナーゼの一次構造(アミノ酸配列)の相同性の高い部分から逆翻訳したオリゴデオキシリボヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の部分断片を得る。このようなプライマーとしては、配列番号3および4に示すアミノ酸配列に相当する配列番号5および6に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。配列番号3および4に示すアミノ酸配列は、後記実施例で詳述するように、枯草菌(バチルス・サチリス(*Bacillus subtilis*))、ラクトコッカス・ラクティス(*Lactococcus lactis*)、マイコプラズマ・ハイオニューモニア(*Mycoplasma hyopneumoniae*)、ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)、ラクトバチルス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)間で、それらが持つラクテートデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列において保存されている領域から選択したもので

ある。

【0021】PCRで得られたDNA断片を適当なクローニングベクター、例えばpGEM-T（プロメガ社製）へサブクローニングし、エシェリヒア・コリJM109株（宝酒造製）を形質転換する。この形質転換株を適当な抗生物質選択下で培養し、培養物から菌体を回収し、菌体から常法、例えばアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出する。このプラスミドに挿入されたDNAの塩基配列を決定することにより、本発明のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片を取得することができる。

【0022】得られたDNA断片の塩基配列は、例えば、ジデオキシスクレオチド酵素法 [Dideoxy chain termination 法; Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 74, p. 5463, (1977)] により決定することができる。

【0023】上記のようにして、後記実施例で得られたラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の部分断片の塩基配列を決定し、アミノ酸配列に翻訳して解析した結果、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の部分断片は、配列番号2記載のアミノ酸配列の86番目から179番目までで示されるアミノ酸配列にあたる部分からなり、またそれをコードする遺伝子は、例えば、配列番号1記載の塩基配列中の256番目から537番目までの塩基配列で示される部分にあたるものであった。

【0024】ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子全体を含むDNA断片を得るには、遺伝子の単離に関する公知のいずれの方法もが使用できるが、例えば、プレバクテリウム・フラバム MJ233等のコリネ型細菌の染色体DNAライブラリーを作製し、上記ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子部分断片をプローブとするハイブリダイゼーションにより、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子全体を含む染色体DNAを単離する方法が挙げられる。以下にその一例を説明する。

【0025】(A) 染色体DNAライブラリーの作製：上記菌株より抽出した染色体DNAを適当な制限酵素、例えばSau3AIを用いて部分分解し、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) 等の宿主ベクター系を用いて染色体DNAのライブラリーを作製する。具体的に使用し得るベクターとしては、例えばλFIXII（東洋紡績（株）製）等のラムダファージベクター、pUC118（宝酒造製）、pBR322（宝酒造製）、コスミドpWE-15（Stratagene社製）等のプラスミドベクターが挙げられる。

【0026】上記部分分解により得られる様々なDNA断片の上記ベクターへの挿入、例えばファージベクターλFIXII（東洋紡績（株）製）への挿入は、適当な制限酵素、例えばSau3AIで開裂したベクターと部分分解DNA断片とをT4DNAリガーゼを用いて連結することにより行うことができる。かくして染色体DNA

Aライブラリーが得られる。

【0027】(B) ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むベクターの選別：上記(A)項で調製した染色体DNAライブラリーからラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むベクターを選別するには、この染色体DNAライブラリーを用いて宿主微生物、例えばエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) の形質導入あるいは形質転換を行い、得られる形質導入体あるいは形質転換体から、適当な手段によりラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を保持するクローンを選別すればよい。

【0028】具体的には、上記ファージベクターをエシェリヒア・コリ (Escherichia coli)、例えばP2392株 [Ausubel et al., Nucleic Acids Res., Vol. 7, p. 1513 (1979)] に感染させ、これを寒天培地上に重層することによりプラークを形成させる。次いでこのプラーク中のファージDNAをニトロセルロース膜に移し取り、このファージDNAを該ニトロセルロース膜に固定し、前記のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の部分断片をプローブとして用いたプラークハイブリダイゼーション [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] を行う。こうして、プレバクテリウム・フラバムMJ233株の染色体DNA由来のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を有するファージベクターを含む形質導入体を検出し、選別することが可能である。

【0029】あるいは上記プラスミドベクターを用いて染色体DNAライブラリーを調製した場合には、このライブラリーDNAでエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) JM109（宝酒造製）を形質転換し、得られた形質転換体から前記のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の部分断片をプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーション法 [R. Bruce Wallace, et al., Nucleic Acids Res., Vol. 9, p. 879 (1981)] を行うことによっても選別可能である。

【0030】更に、上記のようにして選別された形質導入体あるいは形質転換体よりファージDNA、あるいはプラスミドDNAを抽出し、挿入断片を適当な制限酵素でベクターから切り出すことで本発明のDNAを取得することができる。

【0031】上記操作によって切り出されたDNA断片につき、前記のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の部分断片をプローブとして用いてサザンハイブリダイゼーション [E. M. Southern, J. Mol. Biol., Vol. 98, p. 503 (1975)] を行うことにより、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子が挿入DNA断片内に存在することを再

確認できる。

【0032】このようにして得られるDNA断片の1つとして、上記プレバクテリウム・フラバムMJ233株染色体DNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる、大きさが約4.8kbのDNA断片を上げることができる。さらに、上記DNA断片の塩基配列を決定したところ、両断片中にはオープンリーディングフレームの存在が確認され、プレバクテリウム・フラバムMJ233株のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子のコード領域は、後記配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列中のアミノ酸番号1～314の314個のアミノ酸配列をコードする945塩基対から構成されることがわかった。また、得られた塩基配列（配列番号1）には、前記のPCRに用いたプライマーに相当する配列（配列番号5及び6）を含むことが確認された。

【0033】本発明におけるラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子は、天然の細菌、例えばコリネ型細菌の染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製/オリゴ1000OM DNA合成装置（Oligo 1000M DNA Synthesizer）を用いて合成されたものであってもよい。

【0034】また、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性を損なわない範囲で、配列番号2に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードするDNAも、本発明に含まれる。ここで「数個」とは、好ましくは40個以下、より好ましくは20個以下である。

【0035】上記のようなDNAの一態様として、例えば、配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAが上げられる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相溶性が高い核酸同士、例えば、60%以上、好ましくは80%以上の相溶性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相溶性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件が上げられる。

【0036】尚、後述するように、本発明のDNAをコリネ型細菌のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の作製に用いる場合には、該DNAはラクテートデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする必要はなく、生理的条件下、すなわち微生物細胞内で、染色体上のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子と相同組換えを起こすことができ、それによってラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することができる程度の相溶性を有していればよい。このような相溶性としては、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相溶性が挙

げられる。また、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の作製に用いるDNAは、染色体上のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子と相同組換えを起こすことができ、それによってラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することができる程度の大きさであれば、本発明のDNAの一部であってもよい。ここで一部とは、好ましくは50塩基以上、より好ましくは100塩基以上の長さを有するものが上げられる。

【0037】本発明のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子は、例えば、ラクテートデヒドロゲナーゼやリンゴ酸の製造に用いることができる。すなわち、本発明のDNAが導入された微生物、例えば本発明のDNAがベクターに連結されてなる組換えベクターDNAで形質転換された微生物は、ラクテートデヒドロゲナーゼを高生産することが予想される。

【0038】また、本発明のDNAは、コリネ型細菌のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の作製に用いることができる。本発明のDNA又はその一部を用いたコリネ型細菌のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊法としては、該DNAをカナマイシン耐性遺伝子あるいはクロラムフェニコール耐性遺伝子等のマーカーと結合した後、電気パルス法（Electroporation）等により菌体内に導入した後、マーカーで選択することにより、相同組換えによって該ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子部分断片を宿主微生物染色体上へ組み込むことが可能となる（Biosci. Biotech. Biochem., Vol. 57, p. 2036-2038, 1993）。

【0039】かくして得られる微生物から、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株を効率的に取得することができる。上記のようにして得られるラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株は、実質的に活性のあるラクテートデヒドロゲナーゼを産生しないので、アミノ酸、有機酸等の各種ファインケミカルズの製造の際の乳酸の副生を低減することができる。

【0040】本発明の方法により製造されるアミノ酸としては、特に限定されないが、具体的にはリジン、トレオニン、イソロイシン、グルタミン酸等が上げられる。また、本発明の方法により製造される有機酸としては乳酸以外のものであれば特に限定されないが、具体的にはコハク酸、フマル酸、クエン酸等が上げられる。

【0041】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、実施例は本発明の具体的な認識を得る一助とみなすべきのものであり、本発明の範囲を何等限定するものではない。

【0042】〔実施例1〕プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子断片の一部（A断片）のクローン化およびその塩基配列の決定

【0043】（A）プレバクテリウム・フラバムMJ

### ー233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、蒸留水1L〕1Lに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM B P-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液 (pH8.0) -1mM EDTA $\cdot$ 2Na溶液15mlに懸濁した。

【0044】次に、上記懸濁液にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 $\times$ g、20分間、10 $\sim$ 12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液 (pH7.5) -1mM EDTA $\cdot$ 2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、鋳型DNAとして、PCRに使用した。

### 【0045】(B) プライマーの選択

ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子は、原核生物では、バチルス・サチリス (Microbiology, 142, 3047-3056, 1996)、ラクトコッカス・ラクティス (J. Bacteriol., 174, 6956-6964, 1992)、マイコプラズマ・ハイオニニューモニア (J. Gen. Microbiol., 139, 317-323, 1993)、ストレプトコッカス・ミュータンス (GenBank Database Accession No. M72545)、ラクトバチルス・カゼイ (Appl. Environ. Microbiol., 57, 2413-2417, 1991) 等のものが知られている。これら5種の微生物のラクテートデヒドロゲナーゼにおいて保存されている領域を検討し、配列番号3および4のアミノ酸配列を基に、配列番号5および6に示す塩基配列を有する2つのプライマーを選択し、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer) を用いて合成した。

【0046】(配列番号5) CARAARCCNG GNGARAC

(配列番号6) TCNCCRTGYT CNCCNAT

(配列中、RはA又はG、YはC又はT、NはA、G、C又はTを示し、ここでAはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミンを示す。)

【0047】これら2つのプライマーを用いて上記

(1) で調製した染色体を鋳型としてPCRを行うと、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子が存在する限り、(a) と (b) の組み合わせで約300bpの反応産物が得られると期待される。

### 【0048】(C) PCR反応

PCR反応はパーキンエルマーシータス社製のDNAサーマルサイクラーを用いて下記の条件で行った。

### 【0049】反応液：

50mM KCl

10mM Tris-HCl (pH8.4)

1.5mM  $\text{MgCl}_2$

鋳型DNA 5 $\mu\text{l}$

上記(B) で作製したプライマー 各々0.25 $\mu\text{M}$

dNTPs 各々200 $\mu\text{M}$

TaqDNAポリメラーゼ (宝酒造) 2.5units

以上を混合し、100 $\mu\text{l}$ とした。

### 【0050】PCRサイクル：

デナチュレーション過程：94℃ 60秒

アニーリング過程：55℃ 120秒

エクステンション過程：72℃ 180秒

以上を1サイクルとし、30サイクル行った。

### 【0051】(D) 反応物の検出

上記(C) で生成した反応液10 $\mu\text{l}$ を2%アガロースゲルにより電気泳動を行って約300bpの断片の検出を行った。

### 【0052】(E) 増幅断片のクローン化

上記(C) 項で得た反応液3 $\mu\text{l}$ と、PCR産物クローニングベクターpGEM-T (PROMEGAより市販) 1 $\mu\text{l}$ を混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$ 及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0053】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) によりエシエリヒア・コリJM109 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリン50mgを含む培地 [トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1Lに溶解] に塗抹した。

【0054】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpGEM-Tの長さ3.0kbのDNA断片に加え、長さ約300bpの挿入断片が認められた。

### 【0055】(F) 増幅断片の塩基配列の決定

(E) 項で得られた長さが約300bpの増幅断片につ

いて、その塩基配列をジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977) により決定した。その結果得られたDNA塩基配列およびその翻訳アミノ酸配列を配列表配列番号1および2に示す。本アミノ酸配列は、枯草菌、あるいは、ラクトバシルスのラクテートデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列の一部と高い相同性を示し、本DNA断片がブレバクテリウム・フラバム MJ-233株由来のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の部分断片であることが明らかになった。

【0056】【実施例2】ブレバクテリウム・フラバム MJ-233株由来のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子全体のクローニングおよびその塩基配列の決定

(G) ゲノミック・サザンハイブリダイゼーション  
上記(A)項で得たブレバクテリウム・フラバム MJ-233株の染色体DNA溶液の90 $\mu$ lに制限酵素HindIII、50U (units)を加え、37℃で1時間反応させ完全分解し、アガロースゲル電気泳動に供した後、アガロースゲルよりDNAをナイロン膜上に移し取った。前記(E)項で取得したラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子部分断片を、宝酒造製 Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2を用いて、Exo-free Klenow Fragment 及び [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPによりラジオアイソトープラベル [Anal. Biochem., 158, 307-315 (1986)] した。アイソトープラベルされたプローブを用い、常法 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に従ってサザンハイブリダイゼーションを行った。

【0057】その結果、HindIII処理したものは上記ナイロン膜上の約4.8kbの位置に、上記プローブが強くハイブリダイズするDNA断片の存在を確認した。

【0058】(H)ブレバクテリウム・フラバム MJ-233株の染色体DNAライブラリーの作製

上記(A)項で得たブレバクテリウム・フラバム MJ-233株の染色体DNA溶液の90 $\mu$ lに制限酵素Sau3AI 5unitsを加え、37℃で10分間反応させて部分分解した。この様々な長さの部分分解DNAと、制限酵素XhoIで切断後、DNAポリメラーゼクレノーフラグメント (Klenow fragment) を用いてdTTP (2'-デオキシチミジン5'-トリフォスフェート)、dCTP (2'-デオキシシチジン5'-トリフォスフェート) で切断末端を埋めたファージベクター $\lambda$ FIXII ( $\lambda$ FIXII/XhoI-partial fill-in treated DNA: 東洋紡績(株)社製)とを混合し、50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトー

ル、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>、および、T4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、16℃で10時間反応させて部分分解DNAとベクターとを連結させ、染色体DNAの $\lambda$ DNAライブラリーを得た。

【0059】(I) 目的組換え体DNAの選別

上記(H)項で作製した $\lambda$ DNAライブラリーファージ溶液 (2 $\sim$ 5 $\times$ 10<sup>4</sup> pfu; SM緩衝液希釈) と、エシェリヒア・コリP2392の培養液を当量混合し、37℃で15分間保温した。これに50℃にて保温しておいた3 $\sim$ 4mlの $\lambda$ 培地 (1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl、0.2% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.5% 寒天)を加え、 $\lambda$ プレート (1% トリプトン、0.5% NaCl、0.2% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1% 寒天) に均一に塗布し、37℃で12 $\sim$ 16時間培養した。

【0060】この培地上にニトロセルロースフィルターを載せ、培地上に形成されたプラークをフィルターに吸着させ、順次5分間ずつ以下イ)~ハ)の試薬に浸した濾紙上にフィルターをのせて処理した。

【0061】イ) 0.5M NaOH、1.5M NaCl

ロ) 0.5M Tris-HCl (pH 7.5)、1.5M NaCl、1mM EDTA

ハ) 2 $\times$ SSC (20 $\times$ SSC; NaCl 175.3g, クエン酸三ナトリウム二水和物 88.2gを蒸留水1Lに溶解)

上記フィルターを風乾後、80℃にて2時間乾熱処理をしてDNAを固定した。

【0062】前記ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子部分断片をプローブとして用い、上記で作製したフィルターにつきプラークハイブリダイゼーションを常法 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に従って行った。

【0063】この結果、上記ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子部分断片をプローブとしてハイブリダイゼーション陽性のプラークLDH233を選択した。LDH233からファージDNAを抽出し、制限酵素HindIIIにより切断したところ、ゲノミック・サザンハイブリダイゼーションの結果と一致する、長さ約4.8kbのHindIII挿入断片をアガロースゲル電気泳動により確認することができた。

【0064】(J) ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子のサブクローニング: 上記(I)項で得られた長さが約4.8kbのHindIII-DNA断片上に存在するラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の位置をさらに特定するために、該DNA断片を下記のようにプラスミドpUC118 (宝酒造(株)社製)へサブクローニングした。



【0065】上記LDH233から抽出したファージDNAからHindIIIで切り出されるDNA断片と、クローニングベクターpUC118（宝酒造（株）製）を、各々制限酵素HindIIIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液（pH7.6）、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT4DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、16℃で10時間反応させ、上記HindIII断片とベクターを連結させた。

【0066】得られた連結反応液を用い、塩化カルシウム法[Journal of Molecular Biology, Vol. 53, p. 159 (1970)]により エシェリヒア・コリJM109（宝酒造（株）社製）を形質転換し、アンピシリン 50μg/mlを含む培地〔トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5gおよび寒天16gを蒸留水1Lに溶解〕に塗抹した。

【0067】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを各々制限酵素HindIIIにより切断し、ハイブリダイゼーション法を用いて挿入断片を調べたところ、プラスミドpUC118の長さ3.4kbのDNA断片に加え、長さ約4.8kbのHindIII-DNA断片が確認された。

【0068】上記で得られたプラスミドを各々pUC118-LDH233と命名し、該プラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリJM109株（宝酒造（株）製）を各々、ECLDH233と命名した。

【0069】(K) 塩基配列の決定  
上記(J)項で得られたラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む長さが約4.8kbのDNA(HindIII-HindIII)断片について、その塩基配列をpUC118（宝酒造（株）社製）を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法)[Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 74, p. 5463, (1977)]により決定した。

【0070】塩基配列決定の結果、約4.8kbのDNA(HindIII-HindIII)断片は、その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子は、後記配列表の配列番号1に示す塩基配列を有し、314個のアミノ酸をコードする945塩基対より構成されることが判明した。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を、配列番号2に示す。尚、この塩基配列の中には、実施例2の(F)項で決定した塩基配列に相当する配列が含まれていることが確認された。

【0071】〔実施例3〕 プレバクテリウム・フラ

バムMJ-233由来のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子(ldh遺伝子)の発現

(L) MJ-233由来ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子発現ベクターの構築

実施例3で確認された945塩基対より構成される、プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームについて、エシェリヒア・コリ菌体内での発現を確認するため、該DNA断片を下記のようにプラスミドpKK223-3（ファルマシア社製）へサブクローニングした。

【0072】まず、上記オープンリーディングフレームの両端に制限酵素SmaIの切断部位を連結したDNA断片を、下記に示すプライマーを用いてPCRにより、プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを鋳型として増幅した。該PCR断片とクローニングベクターpKK223-3（ファルマシア社製）を、各々制限酵素SmaIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液（pH7.6）、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT4DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、16℃で10時間反応させ、上記SmaI断片とベクターを連結させた。

【0073】

(配列番号7) TCCCCCGGGA TGAAGAAAC CGTCGGC

(配列番号8) TCCCCCGGT CAGAAGAACT GCTTCTG

【0074】得られた連結反応液を用い、塩化カルシウム法[Journal of Molecular Biology, Vol. 53, p. 159 (1970)]により エシェリヒア・コリJM109（宝酒造（株）社製）を形質転換し、アンピシリン 50μg/mlを含む培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト 5g、NaCl 5gおよび寒天16gを蒸留水1Lに溶解〕に塗抹した。

【0075】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素SmaIにより切断し、アガロース電気泳動法を用いて挿入断片を調べたところ、プラスミドpKK223-3の長さ4.6kbのDNA断片に加え、長さ約1kbのDNA断片が確認された。

【0076】これらのプラスミドについて、1kbの挿入断片の方向性の確認を行った。その結果、プラスミドpKK223-3上に存在するtacプロモーターに対して、ldh遺伝子のオープンリーディングフレームが順方向に挿入断片が挿入されたプラスミドを選択し、pKK223-LDH233と命名した。プラスミドpKK223-LDH233でエシェリヒア・コリJM109株を形質転換して得られた形質転換株をエシェリヒア・コリECTacLDH233と命名した。

【0077】(M)ラクテートデヒドロゲナーゼ酵素の製造および活性の確認

上記(L)で作製したエシェリヒア・コリECTacLDH233株をアンピシリン50μg/mlを含むLB培地〔トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl5g〕に植菌し、37℃で15時間好気的に振とう培養した。得られた培養物を遠心分離(3,000×g、4℃、20分間)して菌体を回収後、ナトリウムーリン酸緩衝液〔組成:50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)〕で洗浄した。

【0078】次いで、洗浄菌体0.5g(湿重量)を上記ナトリウムーリン酸緩衝液2mlに懸濁し、氷冷下で超音波破碎器(プランソン社製)にかけ菌体破碎物を得た。該破碎物を遠心分離(10,000×g、4℃、30分間)し、上清を粗酵素液として得た。対照として、エシェリヒア・コリJM109株の粗酵素液を同様に調製し、以下の活性測定に供した。

【0079】ラクテートデヒドロゲナーゼ酵素活性の確認は、両粗酵素液について、ビルビン酸を基質とした乳酸の生成に伴い、補酵素NADHがNAD<sup>+</sup>に酸化されるのを、340nmの吸光度変化として測定した[L. Kanarek and R. L. Hill, J. Biol. Chem. 239, 4202 (1964)]。反応は、50mMカリウムーリン酸緩衝液(pH7.2)、10mMビルビン酸、0.4mMNADH存在下、37℃にて行った。その結果、エシェリヒア・コリJM109株から調製された粗酵素液に対し、エシェリヒア・コリECTacLDH233から調製された粗酵素液は、約50倍ラクテートデヒドロゲナーゼ活性を有していた。

【0080】【実施例4】ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子部分断片を用いたプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来染色体ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊

(N)遺伝子破壊に用いるプラスミドベクターの構築  
上記(E)項で得たプラスミドを20μlについて、50mMトリス緩衝液(pH7.5)、1mMジチオスレイトール、10mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl、制限酵素SphIおよびSalI 1 unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、37℃で1時間反応させ、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子部分断片約300bpとpGEM-Tベクター領域約3kbの2つの断片を得た。得られたDNA溶液からGene Clean II(フナコシ社製)を用いて300bp断片の回収を行い、該DNA溶液10μlと、クロラムフェニコール耐性のクローニングベクターpHSG396(宝酒造社製)1μlのSphI、SalI分解物と混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度であ

る)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0081】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)によりエシェリヒア・コリJM109(宝酒造製)を形質転換し、アンピシリン50mgを含む培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl5g及び寒天16gを蒸留水1Lに溶解〕に塗抹した。

【0082】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpHSG396の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約300bpの挿入断片が認められた。

【0083】(O)プレバクテリウム・フラバムMJ-233株ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の作成

上記(N)項で得られたプラスミドはMJ-233菌体内で複製不可能なプラスミドである。該プラスミドを、電気パルス法(Res. Microbiol., Vol. 14, p. 181-185, 1993)によりプレバクテリウム・フラバムMJ-233に導入し、クロラムフェニコール5μg/mlを含む培地〔尿素2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.5g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.5g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.5g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O6mg、MnSO<sub>4</sub>·4-5H<sub>2</sub>O6mg、ビオチン200μg、チアミン100μg、イーストエキストラクト1g、カザミノ酸1g、グルコース20g、及び、寒天16gを蒸留水1Lに溶解〕に塗抹した。

【0084】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液より染色体DNAを抽出し、以下に述べるゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより染色体上のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊を確認した。染色体DNAを適当な制限酵素で分解した後、ナイロンフィルター(Hybond N アマシャム社製)にブロッティングし、上記で得た300bpのラクテートデヒドロゲナーゼ部分断片をプローブとしてランダムプライマーラベリングキット(<sup>32</sup>P[dCTP]使用)

(宝酒造社製)によりラベル化し、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。野生株より抽出した染色体DNAを用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーションのパターンと比較して、遺伝子破壊株のパターンは(N)項で導入したプラスミド2.5kb分長いバンドが検出され、染色体上のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊が確認できた。このようにして得られたラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株をプレバクテリウム・フラバムESΔldh:cat1と命名した。

【0085】(P)ラクテートデヒドロゲナーゼ酵素の製造および活性の確認

上記 (O) で作製したブレビバクテリウム・フラバム MJ233-Δldh:cat1 株をクロラムフェニコール 5 μg/ml を含む培地 [尿素 2 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6 mg、MnSO<sub>4</sub>·4-5H<sub>2</sub>O 6 mg、ビオチン 200 μg、チアミン 100 μg、イーストエキストラクト 1 g、カザミノ酸 1 g、グルコース 20 g、及び、寒天 16 g を蒸留水 1 L に溶解] に植菌し、30℃で15時間好氣的に振とう培養した。得られた培養物を遠心分離 (3,000×g、4℃、20分間) して菌体を回収後、ナトリウムーリン酸緩衝液 [組成: 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.3)] で洗浄した。

【0086】次いで、洗浄菌体 0.5 g (湿重量) を上記ナトリウムーリン酸緩衝液 2 ml に懸濁し、氷冷下で超音波破碎器 (プランソン社製) にかけて菌体破碎物を得た。該破碎物を遠心分離 (10,000×g、4℃、30分間) し、上清を粗酵素液として得た。対照として、ブレビバクテリウム・フラバム MJ233-ES 株の粗酵素液を同様に調製し、以下の活性測定に供した。

【0087】ラクテートデヒドロゲナーゼ酵素活性の確認は、両粗酵素液について、ピルビン酸を基質とした乳酸の生成に伴い、補酵素 NADH が NAD<sup>+</sup> に酸化されるのを、340 nm の吸光度変化として測定した [L. Kanarek and R. L. Hill, J. Biol. Chem. 239, 4202 (1964)]。反応は、50 mM カリウムーリン酸緩衝液 (pH7.2)、10 mM ピルビン酸、0.4 mM NADH 存在下、37℃にて行った。その結果、ブレビバクテリウム・フラバム MJ233-ES 株から調製された粗酵素

液におけるラクテートデヒドロゲナーゼ活性に対し、ブレビバクテリウム・フラバム MJ233-Δldh:cat1 株から調製された粗酵素液におけるラクテートデヒドロゲナーゼ活性は、10分の1以下であった。

#### 【0088】

【発明の効果】本発明の DNA およびそれを含む組換えベクターは、微生物のラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株の作製に用いることができる。ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株を用いると、培養中の酸素濃度の調節等の操作を行わなくても、アミノ酸、有機酸等の各種ファインケミカルズの製造の際の乳酸の副生を低減することができる。

【0089】また、本発明の DNA は、ラクテートデヒドロゲナーゼの製造に利用することができる。

#### 【0090】

##### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 945

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: ブレビバクテリウム フラバム

株名: MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 1..945

特徴を決定した方法: E

##### 配列

ATG AAA GAA ACC GTC GGC AAT AAG ATT GTC CTT ATT GGC GCA GGA GAT	48
Met Lys Glu Thr Val Gly Asn Lys Ile Val Leu Ile Gly Ala Gly Asp	
5 10 15	
GTT GGA GTT GCA TAC GCA TAC GCA CTG ATC AAC CAG GGC ATG GCA GAT	96
Val Gly Val Ala Tyr Ala Tyr Ala Leu Ile Asn Gln Gly Met Ala Asp	
20 25 30	
CAC CTT GCG ATC ATC GAC ATC GAT GAA AAG AAA CTC GAA GGC AAC GTC	144
His Leu Ala Ile Ile Asp Ile Asp Glu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Val	
35 40 45	
ATG GAC TTA AAC CAT GGT GTT GTG TGG GCC GAT TCC CGC ACC CGC GTC	192
Met Asp Leu Asn His Gly Val Val Trp Ala Asp Ser Arg Thr Arg Val	
50 55 60	
ACC AAG GGC ACC TAC GCT GAC TGC GAG GAC GCA GCC ATG GTT GTC ATT	240
Thr Lys Gly Thr Tyr Ala Asp Cys Glu Asp Ala Ala Met Val Val Ile	
65 70 75 80	
TGT GCC GGC GCA GCC CAA AAG CCA GGC GAA ACT CGC CTC CAG CTG GTG	288
Cys Ala Gly Ala Ala Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Gln Leu Val	
85 90 95	
GAC AAA AAC GTC AAG ATT ATG AAG TCC ATC GTT GGC GAT GTC ATG GCC	336

Asp Lys Asn Val Lys Ile Met Lys Ser Ile Val Gly Asp Val Met Ala	
100 105 110	
AGC GGA TTC GAC GGC ATC TTC CTC GTA GCC TCC AAC CCA GTG GAT ATC	384
Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Ser Asn Pro Val Asp Ile	
115 120 125	
CTC ACC TAC GCA GTG TGG AAA TTC TCC GGC CTG GAA TGG AAC CGC GTG	432
Leu Thr Tyr Ala Val Trp Lys Phe Ser Gly Leu Glu Trp Asn Arg Val	
130 135 140	
ATC GGC TCC GGA ACT GTC CTG GAC TCC GCT AGA TTC CGC TAC ATG CTC	480
Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Met Leu	
145 150 155 160	
GGC GAA CTC TAT GAA GTG GCA CCA AGC TCC GTC CAC GCC TAC ATC ATC	528
Gly Glu Leu Tyr Glu Val Ala Pro Ser Ser Val His Ala Tyr Ile Ile	
165 170 175	
GGC GAA CAC GGC GAC ACT GAA CTT CCA GTC CTG TCC TCC GCG ACC ATC	576
Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Leu Ser Ser Ala Thr Ile	
180 185 190	
GCA GGC GTA TCG CTT AGC CGC ATG CTA GAC AAA GAC CCA GAG CTT GAG	624
Ala Gly Val Ser Leu Ser Arg Met Leu Asp Lys Asp Pro Glu Leu Glu	
195 200 205	
GGC CGT CTA GAG AAA ATT TTC GAA GAC ACC CGC GAC GCC GCC TAT CAC	672
Gly Arg Leu Glu Lys Ile Phe Glu Asp Thr Arg Asp Ala Ala Tyr His	
210 215 220	
ATC ATC GAC GCC AAG GGC TCC ACT TCC TAC GGC ATC GGC ATG GGT CTT	720
Ile Ile Asp Ala Lys Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Ile Gly Met Gly Leu	
225 230 235 240	
GCT CGC ATC ACC CGC GCA ATC CTA CAA AAC CAA GAC GTT GCA GTC CCA	768
Ala Arg Ile Thr Arg Ala Ile Leu Gln Asn Gln Asp Val Ala Val Pro	
245 250 255	
GTC TCT GCA CTG CTC CAC GGT GAA TAC GGT GAG GAA GAC ATC TAC ATC	816
Val Ser Ala Leu Leu His Gly Glu Tyr Gly Glu Glu Asp Ile Tyr Ile	
260 265 270	
GGC ACC CCA GCA GTA GTA AAC CGC CGA GGC ATC CGC CGC GTT GTC GAA	864
Gly Thr Pro Ala Val Val Asn Arg Arg Gly Ile Arg Arg Val Val Glu	
275 280 285	
CTA GAA ATC ACG GAC CAT GAG ATG GAA CGC TTC AAG CAT TCC GCA AAT	912
Leu Glu Ile Thr Asp His Glu Met Glu Arg Phe Lys His Ser Ala Asn	
290 295 300	
ACC CTG CGC GAA ATT CAG AAG CAG TTC TTC TGA	945
Thr Leu Arg Glu Ile Gln Lys Gln Phe Phe	
305 310 314	

【0091】配列番号：2

配列の長さ：314

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Lys Glu Thr Val Gly Asn Lys Ile Val Leu Ile Gly Ala Gly Asp	
5 10 15	
Val Gly Val Ala Tyr Ala Tyr Ala Leu Ile Asn Gln Gly Met Ala Asp	
20 25 30	

His Leu Ala Ile Ile Asp Ile Asp Glu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Val  
 35 40 45  
 Met Asp Leu Asn His Gly Val Val Trp Ala Asp Ser Arg Thr Arg Val  
 50 55 60  
 Thr Lys Gly Thr Tyr Ala Asp Cys Glu Asp Ala Ala Met Val Val Ile  
 65 70 75 80  
 Cys Ala Gly Ala Ala Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Gln Leu Val  
 85 90 95  
 Asp Lys Asn Val Lys Ile Met Lys Ser Ile Val Gly Asp Val Met Ala  
 100 105 110  
 Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Ser Asn Pro Val Asp Ile  
 115 120 125  
 Leu Thr Tyr Ala Val Trp Lys Phe Ser Gly Leu Glu Trp Asn Arg Val  
 130 135 140  
 Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Met Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Leu Tyr Glu Val Ala Pro Ser Ser Val His Ala Tyr Ile Ile  
 165 170 175  
 Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Leu Ser Ser Ala Thr Ile  
 180 185 190  
 Ala Gly Val Ser Leu Ser Arg Met Leu Asp Lys Asp Pro Glu Leu Glu  
 195 200 205  
 Gly Arg Leu Glu Lys Ile Phe Glu Asp Thr Arg Asp Ala Ala Tyr His  
 210 215 220  
 Ile Ile Asp Ala Lys Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Ile Gly Met Gly Leu  
 225 230 235 240  
 Ala Arg Ile Thr Arg Ala Ile Leu Gln Asn Gln Asp Val Ala Val Pro  
 245 250 255  
 Val Ser Ala Leu Leu His Gly Glu Tyr Gly Glu Glu Asp Ile Tyr Ile  
 260 265 270  
 Gly Thr Pro Ala Val Val Asn Arg Arg Gly Ile Arg Arg Val Val Glu  
 275 280 285  
 Leu Glu Ile Thr Asp His Glu Met Glu Arg Phe Lys His Ser Ala Asn  
 290 295 300  
 Thr Leu Arg Glu Ile Gln Lys Gln Phe Phe  
 305 310 314

【0092】配列番号：3

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gln Lys Pro Gly Glu Thr

1 5

【0093】配列番号：4

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ile Gly Glu His Gly Asp

1 5

【0094】配列番号：5

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：RはA又はG、YはC又はT、NはA、G、C又は

CARAARCCNG GNGARAC

【0095】配列番号：6

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCNCCRTGYT CNCCNAT

【0096】配列番号：7

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

TCCCCCGGGA TGAAAGAAAC CGTCGGC

【0097】配列番号：8

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

TCCCCCGGGT CAGAAGAACT GCTTCTG

Tを示す。

17

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：RはA又はG、YはC又はT、NはA、G、C又は

Tを示す。

17

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

27

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

27

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 7/44

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 P 7/44

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 13/04

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 P 13/04

C 1 2 R 1:13)

(72)発明者 寺沢 真人

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内